

抑肽酶预处理对家兔脊髓缺血再灌注 损伤后脊髓水电解质的影响

程 斌¹, 李锋涛¹, 李 勇², 罗文广³

(1 西安交通大学第二医院骨科 710004 西安市; 2 陕西省人民医院骨科 710068;

3 陕西省宝鸡市中心医院骨科 721008)

【摘要】目的:观察抑肽酶预处理对家兔脊髓缺血再灌注损伤后脊髓水电解质的影响,为临床应用抑肽酶治疗脊髓缺血再灌注损伤提供实验依据。**方法:**60 只家兔随机分为缺血再灌注损伤抑肽酶预处理组(A 组)和生理盐水对照组(B 组),每组 30 只。建立家兔脊髓腰骶段缺血模型,恢复血流再灌注 7d。A 组于缺血前 10min 一次性静脉注射抑肽酶 3×10^7 IU/kg,继而用微量泵持续注入 1×10^7 IU/(kg·h);B 组缺血再灌注时间同 A 组,以等量生理盐水代替抑肽酶。缺血前、缺血再灌注后 8h、24h、48h、72h 和 7d 处死动物,取 L4~L5 段脊髓做生化测定, L3~L4 段脊髓做组织病理学检查。**结果:**在缺血再灌注后检测的各时段,A 组较 B 组脊髓含水量、 Ca^{2+} 、 Na^+ 降低, Mg^{2+} 、 K^+ 升高 ($P < 0.05$)。组织病理学检查发现缺血再灌注后 48h, A 组脊髓前角运动神经元轻度肿胀,轮廓清楚,前索轴突分布较均匀;B 组脊髓前角运动神经元固缩变小,前索轴突数量减少,分布紊乱。**结论:**抑肽酶具有降低脊髓缺血再灌注损伤后脊髓中含水量、 Ca^{2+} 和 Na^+ , 增加 Mg^{2+} 和 K^+ 含量作用;对脊髓缺血再灌注损伤具有保护作用。

【关键词】抑肽酶;脊髓;缺血再灌注;水电解质;兔

中图分类号:R683.2, Q591.7 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2005)-11-0683-04

Effect of aprotinin pretreatment of ischemia-reperfusion injury of water-electrolytes content of spinal cord in rabbits/CHENG Bin, LI Fengtao, LI Yong, et al/Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2005, 15(11):683-686

【Abstract】 Objective:To observe the effect of pretreatment of ischemia-reperfusion injury on water-electrolytes content of spinal cord in rabbits, and provide substructural experimental theory. **Method:**Sixty domestic rabbits were randomly divided into aprotinin treatment group (group A) and normal saline control group (group B) with 30 rabbits in each group. The infrarenal segment in abdominal aorta was clamped for 60 minutes to construct the model of lumbosacral spinal cord ischemia in rabbits. Reperfusion was followed and kept on for seven days until the blood flow regained normal. Aprotinin was given 3×10^7 IU/kg as a short time intravenous injection for 10 minutes before ischemia, and then was drilled with micro pump by 1×10^7 IU/(kg·h). Normal saline was used in control group, the ischemia-reperfusion duration between aprotinin treatment group and normal saline group remained same. The rabbits were killed before ischemia and at 8 hour, 24 hour, 48 hour, 72 hour and 7 day after ischemia-reperfusion, L4-L5 segment spinal cords were harvested to detect content of water-electrolytes of spinal cord, and L3-L4 segment spinal cords were put into histopathological examination. **Result:**After 8 hours of ischemia-reperfusion, the content of water, Ca^{2+} and Na^+ were more than that before ischemia, but Mg^{2+} , K^+ were less than that before ischemia ($P < 0.05$). After ischemia-reperfusion 48h, motor neuron turned light tumefaction, their contour were clear, and axis cylinder distributed uniformly in the anterior column in group A, but in group B, the motor neuron turned pyknosis and volume got to minification, the quantity of axis cylinder decreased markedly. **Conclusion:**Aprotinin can decrease the content of water, Ca^{2+} and Na^+ and increase the content of Mg^{2+} , K^+ after ischemia-reperfusion injury to spinal cord of rabbits.

【Key words】Aprotinin; Spinal cord; Ischemia-reperfusion; Water-electrolytes; Rabbit

【Author's address】 Department of Orthopaedics, the Second Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shanxi, 710004, China

至今还没有有效的治疗方法。脊髓损伤后脊髓局部缺血,大量氧自由基生成,脂质过氧化,从而激活白细胞以及释放多种炎性介质,引起神经细胞变性、坏死和程序性凋亡的复杂过程。抑肽酶是从牛肺或胰腺提取的一种丝氨酸蛋白酶抑制剂,它具有多种活性,如保护血小板功能、减少纤维蛋白的溶解、抑止中性粒细胞的激活等,已在减少体外循环手术后的出血、心脑血管肺等缺血再灌注损伤中得到广泛的应用^[1],它还具有防止脑细胞水肿的作用^[2],但在脊髓损伤方面的作用报道较少。本实验通过研究抑肽酶预处理后家兔脊髓缺血再灌注损伤后水电解质及病理变化,观察其在脊髓损伤中的作用效果。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康成年家兔 60 只,雌雄不限,体重 2.0~3.2kg,平均 2.8kg。将动物按随机数字法分为缺血再灌注抑肽酶预处理组(A 组),缺血再灌注生理盐水对照组(B 组),每组 30 只。术前禁食过夜,自由饮水。参照 Tetik 报道的方法建立动物模型^[3]:氯胺酮肌肉注射(50mg/kg)麻醉,取腹正中切口,暴露腹主动脉,于紧邻左肾动脉起始下及腹主动脉分成左右髂总动脉的分叉上方,用动脉夹分别夹闭腹主动脉上下两端,60min 后开放。夹闭前经耳缘静脉注射 150U/kg 肝素抗凝。A 组缺血 60min 再灌注 7d,在缺血前 10min 静脉注射抑肽酶 3×10^7 IU/kg,继而用 Graseby 3500 微量泵(英国 Graseby 公司生产)持续注入 1×10^7 IU/(kg·h)直至实验结束。B 组缺血和再灌注时间同 A 组,以等量生理盐水代替抑肽酶。

1.2 观测指标

1.2.1 水和离子含量测定 每组于缺血前、缺血再灌注后 8h、24h、48h、72h 和 7d 不同时间点取材。静脉注射空气处死动物。迅速取出 T8~L7 全部脊髓置于干冰上,取 L4~L5 段脊髓做生化测定。先用蒸馏水将其表面血迹冲干净,轻柔去除硬脊膜,滤纸吸干水分后,分析天平称重,放入电动恒温干燥箱内,于 111℃干燥 48h 至恒重(同一样本两次测重,质量相差小于 0.02mg 算为恒重),按 Ellicot 公式计算含水量。组织含水量=(湿重-干重)/湿重 $\times 100\%$ 。

向装有干燥标本的瓶中加入浓硝酸和高氯酸

混合溶液[$\text{HNO}_3:\text{HClO}_4(5:2)$](V/V)]5ml,常温下消化 48h 后,将溶液移入烧瓶中,放入 500℃左右的石棉炉中,使样本无机化,用 5%的 HCl 将烧瓶中的无机物溶解,将溶液移入 25ml 溶液烧瓶中,定容后于电感耦合等离子原子发射谱仪(ICP)上测定镁、钙、钠和钾含量,根据以下公式计算脊髓中的上述离子含量:待测离子含量($\mu\text{g/g}$)=测定液离子浓度/样本干重 $\times$ 稀释倍数。

1.2.2 组织病理学观察 缺血再灌注前及缺血再灌注 8h、24h、48h、72h 和 7d 后,切取 L3~L4 段脊髓组织以 4%多聚甲醛固定,HE、免疫组化 NF(单克隆神经微丝抗体)染色后切片(厚 4 μm),光镜下观察,并用日本 Luze-E 型图像分析系统 20 倍物镜下随机测定各切片脊髓前索内轴突数量。

1.3 统计学分析

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验进行相关分析和显著性检验, $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

2 结果

2.1 损伤前后各电解质及水含量的变化

见表 1。与 B 组比较,A 组家兔脊髓组织含水量、钙离子及钠离子含量降低,钾离子及镁离子含量升高。

2.2 组织病理学观察

缺血前脊髓前角运动神经元轮廓清楚,细胞核大多位于中央,轮廓晰可见,尼氏体呈网状排列于核周,胞浆均匀深染,前索轴突分布均匀(图 1、2,后插页 II)。B 组缺血再灌注后 48h,脊髓前角运动神经元固缩,变小,大致呈三角形,胞核结构大多萎缩消失,尼氏体溶解消失,胞浆呈泡状改变,NF 染色强阳性,神经丝紊乱、稀疏、溶解消失,前索轴突数量显著减少,分布紊乱,轴突肿胀、扩大、消失,轴突内 NF 染色阳性(图 3、4,后插页 II)。A 组缺血再灌注后 48h,脊髓前角运动神经元轻度肿胀,轮廓尚清楚,尼氏体呈细尖颗粒状,浅染松散,排列紊乱,NF 染色呈丝网状于胞浆中,分布较均匀,神经丝排列轻度紊乱,前索轴突分布较为均匀(图 5、6,后插页 II)。缺血前 A 组与 B 组脊髓前索内运动神经元轴突平均数量间无显著性差异($P > 0.05$)。缺血再灌注 8h 后两组脊髓前索运动神经元轴突平均数量低于缺血前($P < 0.01$),而 A 组较 B 组脊髓前索内运动神经元轴突平均数量明显高($P < 0.05$)(表 2)。

表 1 抑肽酶预处理组与生理盐水对照组在缺血前及缺血再灌注损伤后不同时相脊髓中水和电解质含量

		缺血再灌注后					
		8h	24h	48h	72h	7d	($\bar{x} \pm s$)
对照组	含水量(%)	67.1±0.82	71.5±1.02	75.8±1.14	78.4±1.25	75.6±1.20	68.3±0.80
	钙离子(μg/g)	287.7±9.7	589.1±18.3	637.0±20.0	668.5±17.4	687.8±17.3	617.3±12.1
	钠离子(μg/g)	6578±115	6825±161	6979±137	7019±147	7041±187	7115±191
	钾离子(μg/g)	11591±287	10987±198	10723±214	10460±253	10304±209	10075±232
	镁离子(μg/g)	456.4±14.1	419.3±12.0	416.1±11.4	408.0±13.8	402.1±15.4	394.3±15.3
实验组	含水量(%)	66.3±0.78	69.5±1.22 ^①	71.9±1.51 ^①	74.0±1.08 ^①	72.9±1.40 ^①	67.3±0.86
	钙离子(μg/g)	281.0±4.8	557.1±17.4 ^①	597.2±16.1 ^②	625.9±17.2 ^②	650.9±13.2 ^②	595.5±12.1 ^①
	钠离子(μg/g)	6570±131	6614±127 ^①	6644±156 ^②	6707±128 ^②	6791±95 ^①	6845±164 ^①
	钾离子(μg/g)	11748±218	11380±243 ^①	11195±203 ^②	10978±221 ^②	10734±188 ^②	10448±261 ^①
	镁离子(μg/g)	461.1±11.9	440.6±13.5 ^①	434.7±9.7 ^①	430.4±14.1 ^①	429.9±16.6 ^①	425.7±18.4 ^①

注:与同时时间点对照组比较^① $P<0.05$;^② $P<0.01$ 表 2 抑肽酶预处理组与生理盐水对照组在缺血前及缺血再灌注损伤后不同时相脊髓前索运动神经元轴突平均数量($\bar{x} \pm s$, 个/1000μm²)

		缺血再灌注后				
轴突平均数	缺血前	8h	24h	48h	72h	7d
对照组	1428.3±83.6	1121.6±61.4	792.2±47.3	476.7±41.6	295.1±31.5	148.6±23.3
实验组	1397.7±71.4	1253.9±54.2 ^①	976.4±61.9 ^①	681.8±56.4 ^①	504.9±39.4 ^①	384.7±44.6 ^①

注:与同时时间点对照组比较^① $P<0.01$

3 讨论

脊髓缺血再灌注损伤的主要机制为脊髓血供减少,导致脊髓组织缺血缺氧,三磷酸腺苷(ATP)储备耗竭,细胞膜 ATP 酶依赖性离子泵功能衰竭,特别是 Na⁺-K⁺ ATP 酶功能衰竭,使细胞内 K⁺外流,细胞内 Na⁺内流,从而使脊髓组织中 Na⁺含量上升, K⁺丢失,电解质紊乱,引起细胞水肿^[4]。细胞水肿又使组织内压增高,引起微循环障碍,组织缺血缺氧加重,最终导致胞溶。Mg²⁺在细胞代谢中起重要作用,它是细胞内 300 多种酶的辅酶,是维持细胞膜完整、正常的细胞呼吸,信使 RNA 与蛋白质合成的必需离子,同时 Mg²⁺对 Na⁺-K⁺梯度的维持、Ca²⁺的转运和累积,有重要功能^[4]。Mg²⁺是 NMDA 受体的生理拮抗剂^[5]。在再灌注损伤脊髓组织中, Mg²⁺减少,影响各种酶活性以及细胞呼吸、RNA 及蛋白质的合成,从而加重缺血再灌注损伤。脊髓损伤时谷氨酸等兴奋性氨基酸(EAA)释放增加,其与脊髓上 NMDA 受体结合,导致 Ca²⁺大量进入细胞内,形成钙超载,激活多种酶类,致 DNA 分子、蛋白质和磷脂降解,大量自由基形成,线粒体水肿、溶解,进一步加重细胞缺氧,形成恶性循环最终导致细胞死亡^[4]。再灌注后黄嘌呤、次黄嘌呤 ATP 代谢产物和黄嘌呤氧化酶(XO)大量生成,产生大量氧自由基,引起严重的炎症反应^[6,7],导致细胞、组织水肿、破坏,血管阻塞或痉挛,进一步加重组织缺血再灌注损伤。

抑肽酶是一种低分子碱性蛋白酶抑制剂,能抑制多种蛋白酶,如胰蛋白酶、纤溶酶、白细胞水解酶、血浆酶、激肽释放酶,并且能够轻微抑制中性粒细胞中的溶酶体弹性蛋白酶、组织蛋白酶 G;还有证据表明它能通过对体外循环中激肽释放酶的抑制而减少中性粒细胞的激活、在血管内聚集,阻塞微循环,减少白细胞释放大量自由基和炎症介质,如 IL28 等毒性物质。它还可抑制补体的激活,减轻炎症反应。抑肽酶所含广谱丝氨酸蛋白酶可能对凝血酶有一定的抑制作用,从而减轻其神经毒性。缓激肽是局部炎症组织中的一种重要的化学介质,它通过激肽释放酶的激活而产生,并且能够通过舒张血管和增加血管通透性而导致组织水肿。Zausinger 等^[8]认为脑缺血水肿的程度与血浆和脑组织中的缓激肽水平紧密相关,通过抑肽酶的预处理能够降低小鼠脑缺血模型中的脑水肿程度。Matsui 等^[9]认为抑肽酶能够促进急性恢复期的脑组织能量代谢。Sirin 等^[10]发现在脊髓中也有

相似的现象。

本实验采用 Tetik 缺血再灌注模型,观察抑肽酶对家兔脊髓缺血再灌注损伤后水、电解质含量的影响以及组织病理学改变。结果发现,缺血再灌注前,生理盐水对照与抑肽酶预处理组脊髓水与电解质含量无显著性差异($P>0.05$)。缺血再灌注 8h 后,两组脊髓水、 Ca^{2+} 与 Na^{+} 均较缺血前增高($P<0.05$), Mg^{2+} 与 K^{+} 较缺血前降低($P<0.05$),两组之间脊髓中水与电解质也有显著性差异($P<0.05$)。说明抑肽酶有效降低了损伤脊髓中 Ca^{2+} 、 Na^{+} 含量,从而减少因 Ca^{2+} 、 Na^{+} 超负荷对神经细胞的毒性,减轻细胞水肿,同时抑肽酶也增加损伤脊髓中 Mg^{2+} 与 K^{+} 含量,这对于维持神经细胞正常代谢有着重要作用。病理学观察结果显示,抑肽酶预处理组与生理盐水对照组相比,在缺血再灌注损伤 24h 后,脊髓前角运动神经元轴突残存数量较多($P<0.01$),神经元形态也较为正常。说明抑肽酶对脊髓缺血再灌注损伤具有保护作用,其对脊髓缺血再灌注保护作用的具体机制,有待进一步研究。

4 参考文献

1. Asimakopoulos G, Thompson R, Nourshargh S, et al. An anti-inflammatory property of aprotinin detected at the level of leukocyte extravasation [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2000, 120 (2): 361-369.
 2. 唐玲, 胡长林, 余震. 实验性缺血性脑水肿的抑肽酶干预研究[J]. 卒中与神经疾病, 2004, 11(4): 231-233.
 3. Tetik O, Yagdi T, Islamoglu F, et al. The effects of carnitine on spinal cord ischemia/ reperfusion injury in rabbits [J]. Thorac Cardiovasc Surg, 2002, 50(1): 11-15.
 4. Ebel H, Gunther T. Magnesium metabolism: a review [J]. J Clin Biochem, 1990, 18(2): 257.
 5. Sadee W, Pfeiffer A, Herz A. Opiate receptors: multiple effects of metal ions [J]. J Neurochem, 1982, 33(3): 659.
 6. 臧虎, 杨小玉, 朱庆三, 等. 大鼠脊髓缺血再灌注损伤后细胞间黏附分子-1 的表达对损伤程度和预后的评估 [J]. 中国临床康复, 2004, 8(5): 884-885.
 7. 张洪涛, 杨惠林, 唐天骝, 等. 兔缺血再灌注脊髓组织中中性粒细胞的浸润变化 [J]. 中国临床康复, 2003, 7(31): 4192-4193.
 8. Zausinger S, Lumenta DB, Pruneau D, et al. Effects of LF16-0687 Ms, a bradykinin B (2) receptor antagonist, on brain edema formation and tissue damage in a rat model of temporary focal cerebral ischemia [J]. Brain Res, 2002, 950(1-2): 268-278.
 9. Matsui H, Kimura A, Yamashiki N, et al. Molecular and biochemical characterization of a serine proteinase predominantly expressed in the medulla oblongata and cerebellar white matter of mouse brain [J]. Biol Chem, 2000, 275(15): 11050-11057.
 10. Sirin BH, Yilik L, Ortac R, et al. Aprotinin reduces injury of the spinal cord in transient ischemia [J]. Eur J Cardiothorac Surg, 1997, 12(6): 913-918.
- (收稿日期: 2005-06-13 修回日期: 2005-09-12)
(英文编审 蒋欣)
(本文编辑 彭向峰)

个案报道

脊髓内多发性结核瘤伴脊髓空洞症 1 例报告

王锐¹, 彭志秦², 田增民¹, 王亚明¹

(1 海军总医院全军神经外科中心 100037 北京市; 2 河北省藁城市人民医院脑外科 052160)

中图分类号: R744.4, R529.3 文献标识码: B 文章编号: 1004-406X(2005)-11-0686-02

患者女性, 20 岁, 因双下肢不完全截瘫近 4 年入院。4 年前患者曾因头痛、头晕伴流涕等不适症状就诊于当地医院, 诊断为“感冒”, 给予对症处理, 病情无缓解。在治疗过程中出现双下肢麻木、无力, 渐发展至双下肢感觉、运动障碍。先后转治多家医院均无明确诊断, 症状也无明显改善。最后诊断为“结核性脑脊髓膜炎”, 给予正规抗痨治疗, 症状得以缓解, 可搀扶下床活动。但出院后未能坚持全程足量抗痨治疗, 病情再次加重, 双下肢瘫痪, 继行抗痨治疗, 症状略有好转, 双下肢仍不能活动。于 2004 年 8 月 31 日收入院。检查: 双下肢肌肉萎缩; 双上肢肌力 5 级, 双下肢

0 级; 双上肢深浅感觉正常, 双下肢消失; 在 T5 平面以下浅感觉明显减退, T10 平面以下消失; 腱反射微弱, 病理反射未引出; 肛门无自主收缩及反射。实验室检查: 脑脊液抗酸杆菌涂片检查阴性, 腰穿脑脊液检查无异常, 胸部 X 线检查未发现异常; 脊柱 MRI 检查示 T5、T7、T10 椎管内可见类圆形及小结节状短 T2 信号影, 边界清楚, 相邻硬膜轻度增厚; 增强 MRI 扫描病变环形增强, 多发小结节状; T4~T6 椎管后硬膜线状增强; T7~T12 髓内广泛空洞形成, 内有分隔(图 1)。拟诊为多发性脊髓内结核瘤。行手术治疗。切

(下转第 693 页)